

透明脳マウスにおける次世代拡散 MRI (DKI) と共焦点顕微鏡による神経線維密度の関係 [大会長賞記録]

入江隆介¹, 鎌形康司¹, Aurelien Kerever², 横沢 俊³,
大竹陽介³, 越智久晃³, 田川一彦⁴, 岡澤 均⁴,
高橋康介^{5,6}, 佐藤香菜子¹, 堀 正明¹, 平澤恵理²,
青木茂樹¹

¹順天堂大学大学院医学研究科放射線医学 ²同老人性疾患病態治療研究センター

³朝日製作所研究開発グループ ⁴東京医科歯科大学難治疾患研究所/脳統合機能研究センター神経病理学分野

⁵中京大学心理学部 ⁶アラヤ・ブレイン・イメージング

背景

Diffusional kurtosis imaging (DKI) は、ガウス分布によらない制限拡散を表す手法として用いられる¹⁾。DKI は様々な疾患に対して広く応用されているが²⁾、組織学的な根拠に乏しいという問題もある。

脳を透明化して三次元イメージング用の顕微鏡で撮影する技術がこれまでに複数開発されており、脳組織を切片としてではなく三次元的に高い解像度で画像化することができる³⁾。今回我々は、DKI の指標と透明脳の共焦点顕微鏡画像データから算出される神経線維密度の相関について検討した。

方法

評価対象を thy-1 yellow fluorescent protein マウスとした。マウスに十分な麻酔をかけ、ヘパリン加リン酸緩衝生理食塩水、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行ったのち、脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒドに漬けて後固定を行った。動物用 7T-MRI (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) を用いて固定脳の全脳 MRI を撮像した。MRI の撮像条件は以下のとおりである。使用シーケンス: 3D diffusion-weighted FSE, repetition time/echo time = 300/33.85 ms, flip angle = 90, echo train

length = 4, number of averages = 2, field of view = 19.2 × 19.2 × 19.2 mm, matrix size = 128 × 128 × 128, voxel size = 150- μ m isotropic voxels, b value = 0, 1000 s/mm² (30 軸), 2000 s/mm² (30 軸), δ/Δ = 8/13 ms, total imaging time = 42 h 20 min. 得られた拡散 MRI データから、fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), axial diffusivity (AD), radial diffusivity (RD), mean kurtosis (MK), axial kurtosis (AK), radial kurtosis (RK) のマップをそれぞれ作成した (Fig. 1 a-g)。拡散 MRI データの解析には Diffusional Kurtosis Estimator (Tabesh et al. Magn Reson Med 2011) を用いた。MRI 撮像後、厚さ 2 mm の検体を作成し、clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis (CUBIC) 法を用いて脳を透明化した⁴⁾。二光子励起顕微鏡 Carl Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて透明脳の共焦点顕微鏡画像データを取得した (Fig. 2)。

顕微鏡画像データ上で、マウス脳の両側線条体に 300 × 300 × 300 μ m の関心領域 (ROI) を合計 48 個置いた。各 ROI について、Imaris Interactive Microscopy Image Analysis software (Bitplane, Zurich, Switzerland) を用いて神経線維密度を算出した。MRI 画像の同部位を視覚的に同定し、各種拡散パラメータを算出した。ピアソンの積率相関係数を用いて神

キーワード diffusional kurtosis imaging, brain clearing, CUBIC, confocal microscopy, mouse

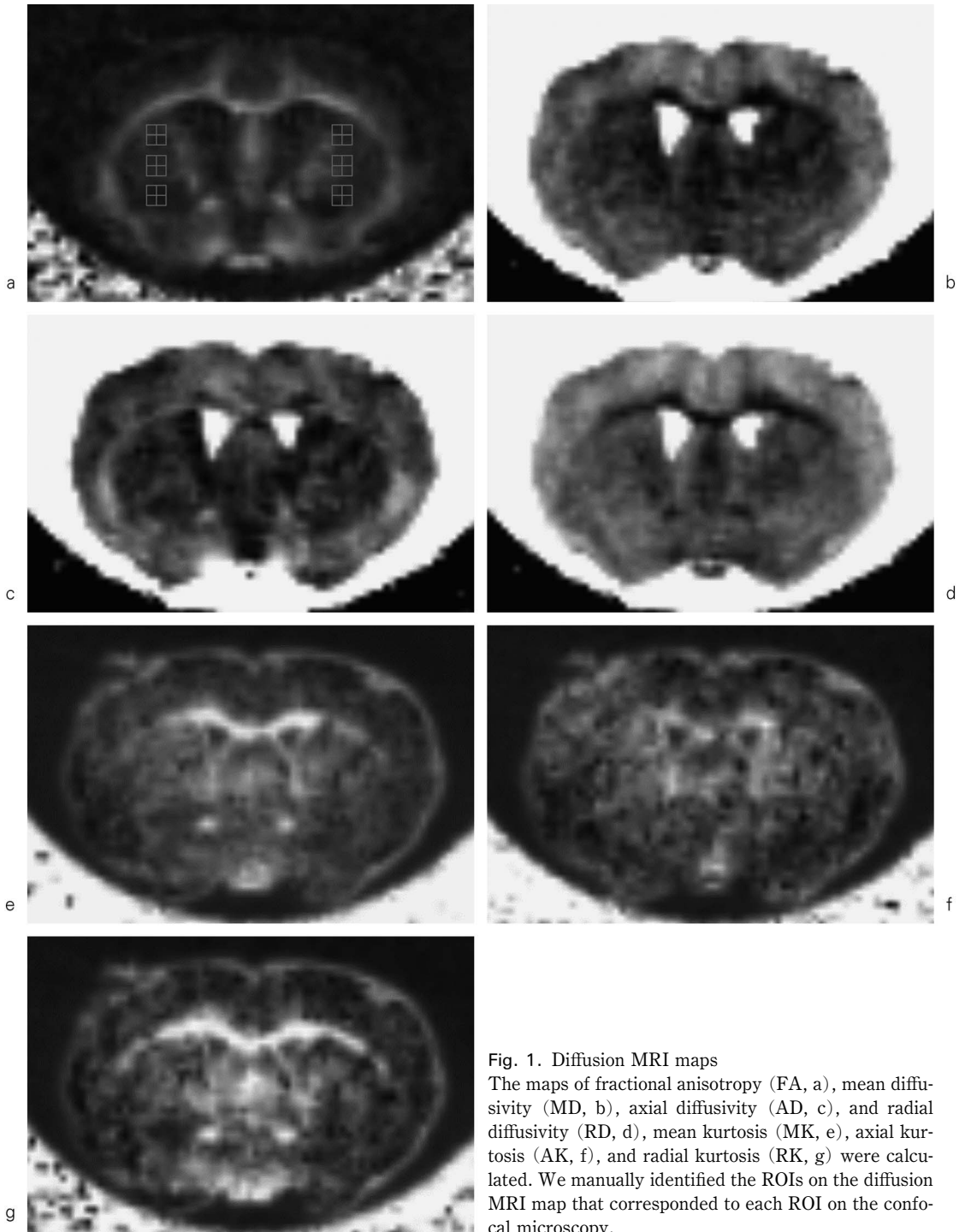


Fig. 1. Diffusion MRI maps

The maps of fractional anisotropy (FA, a), mean diffusivity (MD, b), axial diffusivity (AD, c), and radial diffusivity (RD, d), mean kurtosis (MK, e), axial kurtosis (AK, f), and radial kurtosis (RK, g) were calculated. We manually identified the ROIs on the diffusion MRI map that corresponded to each ROI on the confocal microscopy.

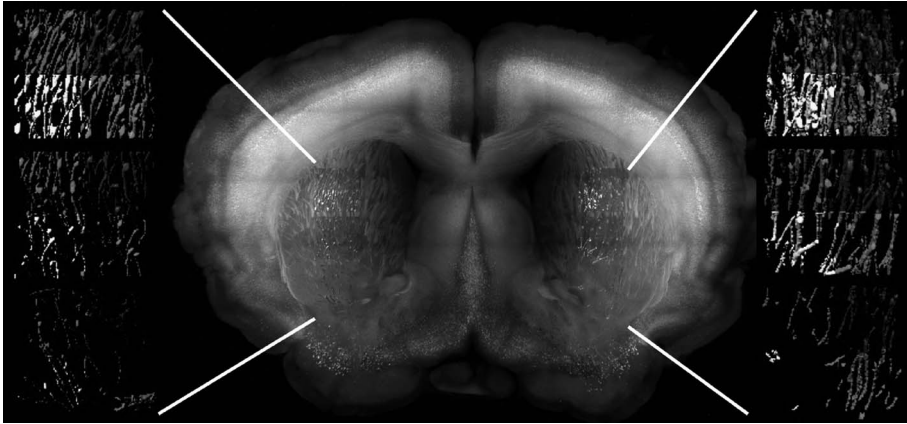


Fig. 2. Confocal microscopy

Forty-eight regions of interest (ROIs) were set on the caudate nucleus and putamen in a confocal microscopy. Twenty-four ROIs were on one coronal section and another 24 ROIs were on the next section. Neurite was extracted and the neurite density was calculated using Imaris software.

神経線維密度と拡散パラメータの相関について検討した (Fig. 3 a-g).

結 果

MK ($r=0.73$, $P<0.001$) および RK ($r=0.74$, $P<0.001$) が神経線維密度と最もよく相関していた. FA と神経線維密度との相関は中等度 ($r=0.42$, $P=0.003$) であった.

考 察

今回の検討により, DKI パラメータが線条体の神経線維密度と強く相関することが示された. 特に RK との相関が強くみられており, RK が軸索密度と相関するというこれまでの知見と一致する.

先行研究において, 内側毛帯などの神経線維の方向が揃っている部位では FA と神経線維密度が強く相関するが, 線条体などの交叉線維の多くみられる部位では強く相関しないことが示されている⁵⁾. 今回の結果から, DKI のパラメータは交叉線維の多い部位においても神経線維密度とよく相関し, 複雑な構造をもつ組織の評価に有用と考えられる.

今回の検討では視覚的に顕微鏡画像データと拡散 MRI マップに ROI を置いて計測を行ったが, より信頼性の高いデータを得るためには,

透明脳の顕微鏡画像と MRI のレジストレーションを行う必要があると考える. また, 拡散 MRI の様々な指標との比較を行うために, 神経線維密度の他に顕微鏡画像から得られる定量的指標を検討していくことが課題である.

結 語

MK および RK は, FA よりも線条体の神経線維密度とよく相関する. DKI は交叉線維を含む組織の微細構造をよく反映すると考えられる. なお, 本発表の内容は現在英文誌に投稿中である⁶⁾.

文 献

- 1) Jensen JH, Helpert JA : MRI quantification of non-Gaussian water diffusion by kurtosis analysis. NMR Biomed 2010 ; 23 : 698-710
- 2) Hori M, Fukunaga I, Masutani Y, et al. : Visualizing non-Gaussian diffusion : clinical application of q-space imaging and diffusional kurtosis imaging of the brain and spine. Magn Reson Med Sci 2012 ; 11 : 221-233
- 3) Kerever A, Kamagata K, Yokosawa S, et al. : See-through brains and diffusion tensor MRI clarified fiber connections : a preliminary microstructural study in a mouse with callosal agenesis. Magn Reson Med Sci 2015 ; 14 : 159-162

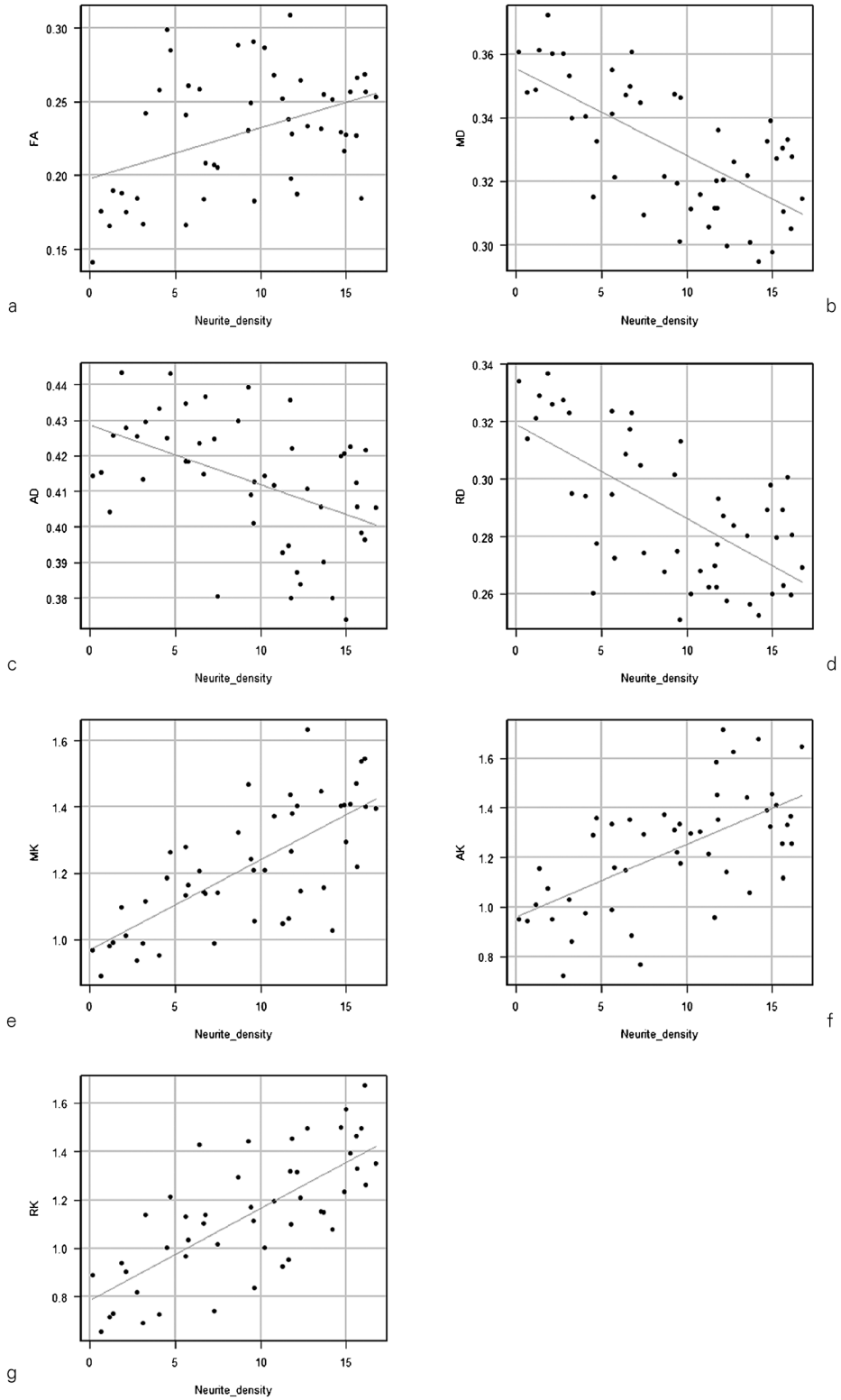


Fig. 3. The correlations between the diffusion metrics and neurite density

- 4) Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, et al. : Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 2014 ; 157 : 726-739
- 5) Kamagata K, Kerever A, Yokosawa S, et al. : Quantitative histological validation of diffusion tensor MRI with two-photon microscopy of cleared mouse brain. *Magn Reson Med Sci* 2016 ; 15 : 416-421
- 6) Irie R, Kamagata K, Kerever A, et al. : The relationship between neurite density measured with confocal microscopy in a cleared mouse brain and analysis with diffusion tensor and diffusion kurtosis imaging. 2017 submitted

The Relationship between Diffusional Kurtosis Imaging and Neurite Density Measured with a Confocal Microscopy for a Cleared Mouse Brain [Presidential Award Proceedings]

Ryusuke IRIE¹, Koji KAMAGATA¹, Aurelien KEREVER²,
Suguru YOKOSAWA³, Yosuke OTAKE³, Hisaaki OCHI³,
Kazuhiko TAGAWA⁴, Hitoshi OKAZAWA⁴, Kohske TAKAHASHI^{5,6},
Kanakano SATO¹, Masaaki HORI¹, Eri ARIKAWA-HIRASAWA²,
Shigeki AOKI¹

¹*Department of Radiology, Juntendo University Graduate School of Medicine
2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421*

²*Research Institute for Diseases of Old Age, Juntendo University Graduate School of Medicine
³Research & Development Group, Hitachi Ltd.*

⁴*Department of Neuropathology, Tokyo Medical and Dental University*

⁵*Department of Psychology, Chukyo University*

⁶*Araya Brain Imaging*

Purpose : Diffusional kurtosis imaging (DKI) enables sensitive measurement of tissue microstructure by quantifying non-Gaussian diffusion. Although DKI is widely applied in many clinical situations, a histological foundation of the analysis results of DKI is lacking. The purpose of this study was to determine the relationship between DKI metrics and the neurite density measured using confocal microscopy of a cleared mouse brain.

Materials and Methods : One thy-1 yellow fluorescent protein mouse was deeply anesthetized and perfusion fixation was performed. The brain was carefully dissected and whole-brain MRI was performed using a 7T animal MRI system. DKI and diffusion tensor imaging (DTI) data were obtained. After MRI scanning, brain sections were prepared and then cleared using the clear, unobstructed brain imaging cocktails and computational analysis (CUBIC) method. Confocal microscopy was performed using a Carl Zeiss LSM 780 two-photon microscope. Forty-eight regions of interest (ROIs) were set on the caudate nucleus and putamen on a confocal microscopic image and a MR image. In each ROI, neurite density was calculated using the Imaris Interactive Microscopy Image Analysis software. The metrics of DKI and DTI, such as mean kurtosis (MK), radial kurtosis (RK), fractional anisotropy (FA), and mean diffusivity, were also calculated. The correlations between the diffusion metrics and neurite density were analyzed using Pearson correlation coefficients.

Results : MK ($r=0.73$, $P<0.001$) and RK ($r=0.74$, $P<0.001$) strongly correlated with neurite density in the caudate nucleus and putamen. The correlation between FA and neurite density was moderate ($r=0.42$, $P=0.003$).

Conclusion : MK and RK were strongly correlated with neurite density.